

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

Hannaliis Ansip

**Monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusele Vietnami
meeste seas**

Magistritöö

40 EAP

Juhendajad: Sulev Kõks, MD, PhD

Ele Prans, MSc

Olga Žilina, PhD

TARTU 2018

INFOLEHT

Monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusele Vietnami meeste seas

Monoamiinoksüdaas-A (MAO-A) on ensüüm, mille ülesanne on neurotransmitterite - dopamiini, noradrenaliini ja serotoniini oksüdatiivse deaminatsiooni katalüüsimine. Ensüümi kodeeriva geeni promootorpiirkonnas paiknevad polümorfismid on näidatud mõjutavat MAO-A aktiivsust ajus. Antud töös uuriti nende polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusele, sealhulgas ka nikotiinisõltuvusest vabanemise faktoritele. Töös käsitleti nikotiinisõltuvust mõjutegurite ja *MAOA* alleelide vahelist seost. Uuringu käigus leiti seos ühe sõltuvuse tugevust mõjutava teguriga. Uurides sõltuvusest vabanemist leiti alleelide esinemissageduse ja loobumise tahte olemasolu ning üritamise vaheline seos. Hinnati ka *MAOA* polümorfismide rolli suitsetamise alustamise vanusele, ja leiti oluline erinevus. Need tulemused aitavad paremini mõista nikotiinisõltuvuse geneetilist tausta ning personaalmeditsiini arenguga võiks olla suund sõltuvuse paremaks raviks ja ka efektiivsemate ravimite loomisel.

Märksõnad: monoamiinoksüdaas-A, uVNTR polümorfismid, nikotiinisõltuvus, suitsetamine.

CERCS B220 Geneetika, tsütogeneetika

Monoamine oxidase A uVNTR polymorphism impact on nicotine addiction in Vietnamese males

Monoamine oxidase A is an enzyme that catalyzes the oxidative deamination of neurotransmitters, like dopamine, noradrenaline and serotonin. The *MAOA* gene promotor variable number tandem repeats (VNTR) cause different activity of MAO-A in brain. This research paper describes the effects of *MAOA*-uVNTR on nicotine addiction in smokers. It is investigated how the strength of nicotine addiction is affected. During the analysis the difference in the age of starting smoking was evaluated in relations with the polymorphisms. The assessment of allele frequencies and the will to give up smoking was also carried out. This research helps to understand better the genetic background of nicotine addiction and may help to improve the treatment of the condition in the future.

Keywords: monoamine oxidase A, uVNTR polymorphisms, nicotine addiction.

CERCS B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1 Monoamiinoksüdaaside ülevaade.....	7
1.2 Kliiniline olulisus	8
1.3 Suitsetamine	8
1.4 Nikotiinisõltuvuse molekulaarne mudel.....	10
1.5 Suitsetamisest loobumise ravi	12
1.6 Sõltuvuste senituvastatud geneetiline taust	14
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	15
2.1 TÖÖ EESMÄRK.....	15
2.2 MATERJALID JA METOODIKA	16
2.2.1 Valimi kirjeldus.....	16
2.2.2 DNA eraldamine	17
2.2.3 Uuringus osalejate sõltuvuskäitumise taustinfo	17
2.2.4 uVNTR määramise PCR metoodika.....	17
2.2.5 Statistiline analüüs.....	20
2.3 UURINGU PIIRANGUD.....	21
2.4 TULEMUSED	22
2.4.1 Valimi ülevaatlised karakteristikud.....	22
2.4.2 Haigena suitsetamise seos <i>MAOA</i> alleelidega.....	24
2.4.3 <i>MAOA</i> polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusest vabanemisele	24

2.4.4 MAOA polümorfismide mõju suitsetamise alustamise vanusele	25
2.5 ARUTELU	26
JÄRELDUSED	30
KOKKUVÕTE	31
SUMMARY	32
TÄNUAVALDUSED	33
KASUTATUD KIRJANDUS	34
LISA 1. Osalejate ankeet	39
Lihtlitsents	41

KASUTATUD LÜHENDID

dVNTR - *distal variable number tandem repeats*, distaalsed varieeruva hulga kordustega tandeemsed järjestused

GABA - *gamma amino butyric acid*, gamma aminovõihape

FTND - *Fagerstrom Test for Nicotine Dependence*, Fagerstromi nikotiinisõltuvuse skaala

MAO -A - *monoamine oxidase-A*, monoamiinoksüdaas-A

MAO-B - *monoamine oxidase-B*, monoamiinoksüdaas-B

NAc - *nucleus accumbens* piirkond ajus

nAChRs - *nicotinic acetylcholine receptors*, nikotiini atsetüülkoliini retseptorid

NRT - *nicotine replacement therapy*, nikotiini asendus ravi

uVNTR - *upstream variable number tandem repeats*, varieeruva hulga kordustega tandeemsed järjestused, ülesvoolu suunas

WHO – *World Health Organization*, Maailma Terviseorganisatsioon

SISSEJUHATUS

Suitsetamine on niivõrd levinud probleem, et Maailma Terviseorganisatsioon on kuulutanud selle globaalseks epideemiaks (WHO, 2017). Suitsetamisega sissehingatavad kartsinogeensed ühendid põhjustavad organismis, eelkõige kopsukoes, mutatsioone, mille häirunud parandus-mehhanismide korral tekib oht vähi arenguks (Pfeifer jt., 2002). Suitsetamise tagajärjel tekkiv hingamisteede ärritus viib krooniliste põletikkude tekkimiseni, mis omakorda võib soodustada kasvajate teket. Nikotiin on tubaka suitsus leiduv psühhoaktiivsete toimetega aine, mis on peamine mõjutegur suitsetamise ehk nikotiin sõltuvuse kujunemiseks.

Käesolevas uurimistöös analüüsiti monoamiinoksüdaas-A rolli nikotiini sõltuvuses. Ensüümid monoamiinoksüdaas-A ja -B omavad ajus neurotransmitterite regulatsiooni funktsiooni. Nikotiini sõltuvuses on nende roll suitsetamise positiivsete mõjude pikaajsem tundmine, ensüümide aktiivsuse regulatsiooniga toimub serotoniini ehk heaolu tunnet reguleeriva monoamiini toimeaja mõjutamine.

Antud magistritöö keskendub monoamiinoksüdaas-A geeni promootorpiirkonna polümorfismide mõju nikotiini sõltuvusele uurimisele. Vaatluse all on uVNTR (*upstream variable number tandem repeats*) polümorfismid, mida on teada, et mõjutavad monoamiinoksüdaas-A aktiivsust. Monoamiinoksüdaaside ja nende polümorfismide, uVNTR ja dVNTR (*distal variable number tandem repeats*), uurimine on aktuaalne teema, uuringutes on tõestatud uVNTR ja dVNTR mõju geeni transkriptsiooni aktiivsusele ja läbi selle on mõjutatud ensüümi aktiivsuse tase ajus (Manca jt., 2018).

Uuringus määrati katsealuste DNA-st uVNTR polümorfismid ja analüüsiti nende esinemist nikotiini sõltuvuskäitumise aspektidega, lähtuvalt uuritavate poolt täidetud küsimustikest saadud andmetest. Uuringus osalejad on Vietnamist pärit mehed, Eesti ja Vietnami koostöö meditsiiniteaduste valdkonna projekti raames. Nikotiini sõltuvuse uurimine aitab mõista sõltuvuse kujunemist molekulaarsel tasandil, see on vajalik nii haiguse mõistmise seisukohalt kui ka selle ravimise ja uute ravimite loomise jaoks.

Käesolev magistritöö on valminud Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditsiini Instituudi patofüsioloogia osakonna laboris.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Monoamiinoksüdaaside ülevaade

Monoamiinoksüdaasid (MAO) on mitokondriaalsed ensüümid, mille funktsioon on oksüdeerida väikesemolekulisi monoamiine ja polüamiine, modifitseeritud aminohappeid valkudes (Gaweska ja Fitzpatrick, 2011). Monoamiinoksüdaasid metaboliseerivad katehholamiine nagu noradrenaliin, dopamiin ja serotoniin jt (McAllister, 2015). Monoamiinoksüdaaside perekonda kuuluvad monoamiinoksüdaas-A (MAO-A) ja monoamiinoksüdaas-B (MAO-B), mis degradeerivad biogeenseid amiine ja seeläbi kontrollivad neurotransmitterite hulga taset kesknärvisüsteemis (Domschke, 2005). Aminohappelise järjestuse alusel on MAO-A ja MAO-B sarnased umbes 70% ulatuses, ensüümidel on erinev afiinsus monoamiinidele: MAO-A metaboliseerib eelistatult serotoniini (5-hüdroksütrüptamiin), noradrenaliini ja dopamiini; MAO-B metaboliseerib bensüülamiini, dopamiini ja fenüületüleeni; noradrenaliini ja serotoniini metabolism on MAO-B puhul vähemeelistatud ja toimub aeglasemalt (Gaweska ja Fitzpatrick, 2011). Ensüümi aktiivsus on tähtis normaalseks aju arenguks. Geneetiliselt determineeritud, aga ka toitumisest sh vitamiinide defitsiitidest, ja ka suitsetamise poolt mõjutatud ensüümiaktiivsuse tase omab rolli isiksuse ja sõltuvuskäitumise kujunemises (Youdim jt., 2006).

Monoamiinoksüdaas-A ja -B variante kodeerivad geenid *MAOA* ja *MAOB*, mis paiknevad X kromosoomi lühikesel õlal regioonis Xp11.3. *MAOA* geeni promootorpiirkonnas asub varieeruva arvu tandemse korduse (*variable number tandem repeat*, uVNTR) polümorfne sait (Voltas jt., 2015). *MAOA*-uVNTR polümorfismid on 30 bp pikkused kordusjärjestused 1,2 kb *MAOA* geeni kodeerivast järjestusest eespool; seni on identifitseeritud 2-, 3-, 3.5-, 4-, 5- ja 6-kordsed kordused (Brummett jt., 2007, Jacob jt., 2005). Uuringutest eri variantide mõjust transkriptsioonilisele aktiivsusele on leitud, et 3-kordne kordus viib geeni madalama transkribeerimiseni, 3.5- ja 4-kordne kordus on kõrgema efektiivsusega, teiste variantide puhul ei ole üheselt kindlaks tehtud mõju geeni aktiivsusele (Brummett jt., 2007). Geeni paiknemine X-kromosoomil võimaldab naistel olla heterosügootsed alleelide kandjad, mehed on homosügootsed; senini ei ole teada heterosügootsuse mõju geeniekspressiooni aktiivsusele.

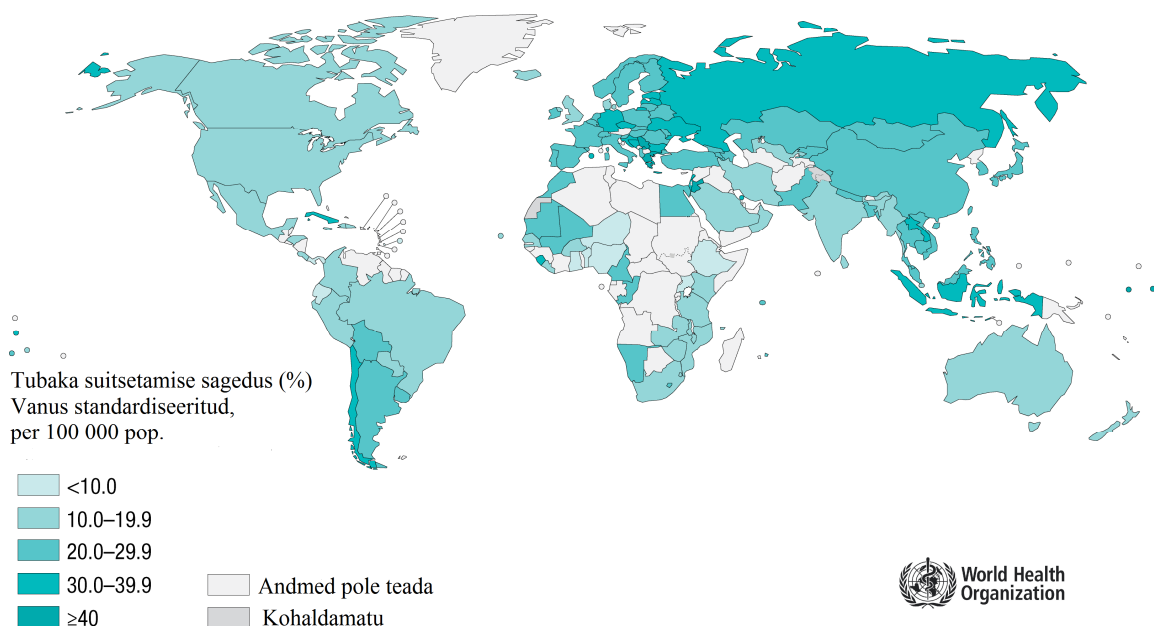
1.2 Kliiniline olulisus

MAO-A ja MAO-B rolli neurotransmitterite inaktivatsioonis, ning monoamiinoksüdaaside düsfunktsiooni seostatakse erinevate neuroloogiliste ja psühhiaatriliste haiguste kujunemises. MAO-A ja MAO-B aktiivsuse muutust on leitud depressiooni ning aktiivsus ja tähelepanuhäire (*attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) korral (Domschke, 2005, Meyer, 2006). Monoamiinoksüdaaside inhibiitorid (MAOI) on kasutusel antidepressantidena, inhibeeritakse MAO-A või MAO-B ensüümi tööd, mille tagajärjel noradrenaliini, serotoniini ja dopamiini lõhustatakse vähemal määral ja nende neurotransmitterite kontsentratsioon suureneb ajus. Lisaks depressiooni ravimisele on võimalik kasutada MAOId ärevushäirete, sh paanikahäire ja sotsiaalfobia puhul; MAO-B inhibiitoreid ka Parkinsoni tõve ja Alzheimeri tõve korral (Stahl ja Felker, 2008, Youdim jt., 2006).

1.3 Suitsetamine

Suitsetamine on ülemaailmselt levinud probleem (Joonis 1). Kõige suuremad suitsetajate sagedused esinevad Euroopas ja Aasias (sh Kagu-Aasias). Nendes piirkondades on kriitilise tähtsusega läbiviidavad suitsetamise ennetustööd, seadusemuudatused jm, eesmärgiga vähendada sigarettide tarbimist ja läbi selle mõjutada inimeste paremat tervist.

Vanus standardiseeritud suitsetamise levik inimeste seas alates 15. eluaasta vanustest ja vanemad, 2015



Joonis 1. Suitsetamise ülemaailmne levimus, alates 15. eluaastast (WHO, 2016).

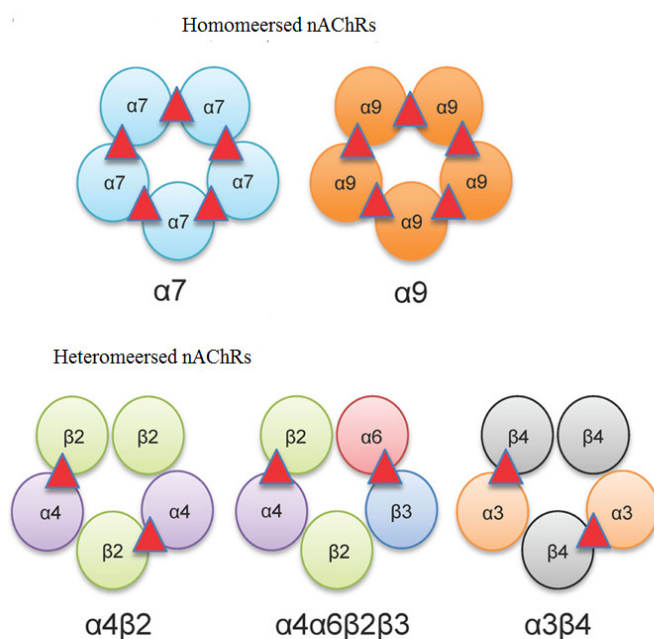
Tervise Arengu Instituudi poolt 2016. aastal läbiviidud tervisenäitajate uuringus Eesti täiskasvanud rahvastiku (vanusegrupp 16-64 eluaastat) seas oli igapäevaseid mees-suitsetajaid 29,9%, Eesti naiste seas on igapäevaseid suitsetajaid 15,5% (Veideman ja Tekkel, 2017). Samas Tartu Ülikooli Geenivaramu andmetele tuginevas uuringus näidati, et kogu valimist (n=51 756) oli meeste, vanusest alates 18. eluaasta (n=17 777), seas suitsetajaid: endiseid 20,8% ja hetkel suitsetavaid 39,8%; naiste seas, vanuses samuti alates 18. eluaasta (n=33 979), suitsetajaid: endiseid 10% ja hetkel suitsetavaid 22,7% (Kõks jt., 2017). Seega Eestis on suitsetajate osakaal üle poole populatsioonist. Vietnami üldisest populatsioonist (vanuses 15+ eluaastat) aastal 2015 oli suitsetajaid 22,5%, kuid meeste seas oli suitsetajaid 45,3% ja naiste seas 1,1% (Van Minh jt., 2017, WHO, 2017).

Nikotiini tarvitamisest tulenev kahju on eelkõige tubaka suitsetamisega sissehingatavast kahjulikest ühenditest näiteks etüleenoksiid, 1,3-butadien, atseetaldehüüd jpt (Pfeifer jt., 2002). Suitsetajate suurenenud haigusriskid on seotud peamiselt suurenenud riskiga hingamiselundkonnale, kardiovaskulaarhaiguste ning pahaloomuliste kasvaja tekkeks, mille ravimine on tervishoiusüsteemidele kulukas (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). Kopsuvähi suhteline elulemus Eestis on 13%, see tähendab, et haigus diagnoositakse sageli liiga hilja ja ka parim saadaolev ravi võib osutuda vaid palliatiivseks (Innos ja Aareleid, 2016).

Suitsetamine on ülemaailmselt iga-aastaselt vähenenud, kuid jätkuvalt on tegu probleemse valdkonnaga, seda nii Eestis kui ka Vietnamis, kus suur osa populatsioonist on suitsetajad. Suitsetamisvastane ennetustöö on aktiivne, kuid lisaks on vajadus luua efektiivset farmakoteraapiat nikotiini sõltuvuse raviks. Oluline on selgitada välja sõltuvuse kujunemise täpsed mehhanismid, seejärel oleks võimalik senisest paremat ravi rakendada, luues sihtmärgipõhisemaid terapeutikume. Samas on eesmärgiks ka sõltuvuste tekke ja tugevuse geneetilise tausta uurimine, mis võimaldaks selgitada ravimite sobivuse ja edukuse erinevatel patsientidel. Suitsetamisest loobumise edukus on madal, hinnanguliselt 80% suitsetamisest loobumise üritajatest hakkavad uuesti suitsetama esimese kuu jooksul, vaid 3% loobujatest suudab säilitada vähemalt 6 kuud ilma taasalustamiseta (Benowitz, 2009).

1.4 Nikotiinisõltuvuse molekulaarne mudel

Nikotiin avaldab toimet ajus läbi neuronitel paiknevate nikotiini atsetüülkoliini retseptorite (*nicotinic acetylcholine receptors*, nAChRs). Funktsionaalse retseptori moodustavad viis membraan-seoselist alaühikut α ja β (Joonis 2) (Hendrickson jt., 2013, Tuesta jt., 2011). Retseptori moodustavad vastavalt kas heteromeerselt või homomeerselt alaühikutest (Joonis 2). Alaühikute esinemine on lokalisatsiooni-spetsiifiline (Tabel 1) ja retseptori alaühikute varieeruvus sõltub neuronite paiknemises, näiteks erinevates aju piirkondades.



Joonis 2. Nikotiini atsetüülkoliini retseptorite ehitus (Hendrickson jt., 2013)

Inimesel on identifitseeritud 16 erinevat nAChRs alaühikut/geeni (Tabel 1), kõige levinumad retseptori alatiübid ajus on $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ ja $\alpha 7$ (homomeerina) (Joonis 2) (Benowitz, 2009). Mesolimbiline dopamiini (DA)-süsteem on keskne sõltuvuse mediaator, läbi dopaminergiliste neuronite (DA-neuronite) toimub sõltuvust tekitavate ainete tarvitamisel tekkiv mõnutunne ja ka sõltuvuse kujunemise tugevnemine (Picciotto ja Kenny, 2013). Senini teaduslikult tõestatult vahendab peamiselt $\alpha 4\beta 2$ retseptor nikotiini sõltuvust, mis esineb DA-neuronitel (Benowitz, 2009, Tuesta jt., 2011).

Tabel 1. Inimese nikotiini atsetüülkoliini retseptorite jaotus paiknemise alusel ja geenid

Neuronaalselt paiknevad tüübid		Lihastes paiknevad tüübid	
$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 9, \alpha 10, \beta 2, \beta 3, \beta 4$		$\alpha 1, \beta 1, \delta, \gamma, \varepsilon$	
α geenid	<i>CHRNA1, CHRNA2, CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNA9, CHRNA10</i>		
β geenid	<i>CHRNA1, CHRNA2, CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNA9, CHRNA10</i>		
$\delta/\varepsilon/\gamma$	<i>CHRNA1, CHRNA2, CHRNA3, CHRNA4, CHRNA5, CHRNA6, CHRNA7, CHRNA9, CHRNA10</i>		

DA-ergiline rada lähtub ventraalsest tegmentaalsest piirkonnast (*ventral tegmental area*, VTA) keskajus. Lisaks dopaminergilistele neuronitele VTAs on ka γ -aminovõihappe-ergilised (*γ -aminobutyric acid*, GABA) neuronid, millel on samuti $\alpha 4\beta 2$ retseptor (Tuesta jt., 2011). VTA piirkonnast tulev stiimul avaldab mõju läbi DA- ja GABA-ergiliste neuronite depolariseerumise aju piirkonnas *nucleus accumbens* (NAc), mis on ventraalses juttkehas (*ventral striatum*), ja prefrontaalkorteksis (*prefrontal cortex*); kus neuronite sünapst vabaneb dopamiin, ja lisaks ka teisi neurotransmittereid: noradrenaliin, atsetüülkoliin, serotoniin, GABA, glutamaat ja endorfiinid (Benowitz, 2009, Tuesta jt., 2011).

Vabanenud neurotransmitterid haaratakse neuronisse tagasi läbi vastavate membraanseoseliste transportvalkude. Kateholamiine lagundab rakust väljaspool ensüüm katehool-O-metüültransferaas (*catechol-O-methyltransferase*, COMT). Rakku tagasihaaratult lagundab dopamiini monoamiinoksüdaas, eelistatult MAO-A aga ka MAO-B. Uuringutest on leitud, et sigaretsuitsuga inhaleeritavad ühendid põhjustavad monoamiinoksüdaaside madalama taseme suitsetajatel (Tuesta, 2011). Tubaka suitsus sisalduvad molekulid, mis on näidatud MAO-A ja MAO-B inhibitoorse efektiga, mis on hetkeks tuvastatud, kuuluvad β -karboliin alkaloidide rühma, norharmaan (β -karboliin) ja harmaan (1-metüül- β -karboliin) (Herraiz ja Chaparro, 2005). Monoamiinoksüdaaside inhibeerimine mõjutab dopamiini saadavust, ja mõjutab

suitsetamise sõltuvuse kujunemist koos nikotiini mõjuga aditiivselt. Katsetest hiirtega on näidatud, et monoamiinoksüdaaside suitsetamistest tulenev inhibitsioon suurendab hiirtel tungi nikotiini omale manustada, seeläbi soodustades pidevat vajadust nikotiini järele (Guillem jt., 2005). Samas toimuvad nikotiini korduval manustamisel teatavad neuronaalsed adaptatsioonid, eelkõige nAChRs ülesregulatsioon, mis soodustab veelgi sõltuvust ja tolerantsust selliselt tasemel, et loobumise korral tekivad ärajääma nähud (Ho ja Tyndale, 2007).

Inimese aju saavutab täieliku küpsemise eessagar alles 25. eluaastal, nikotiin kui psühhoaktiivne aine mõjutab väga kergesti teismeliste arenevat aju ja selle keemilist tasakaalu. Noorukieas suitsetades suurendab nikotiin $\alpha 4$ ja $\beta 2$ alaühikuid sisaldavate nAChRs ekspressiooni eessagaras, selle tagajärjel suureneb nikotiin-indutseeritud GABA-ergiliste sünapside ülekanne (Goriounova ja Mansvelder, 2012). See tähendab seda, et enne eessagara täieliku arenemise lõppu on nikotiini mõju ajule suurem, kuna nikotiini molekulaarne efekt on suurem, saadavad positiivsed mõjud on intensiivsemad ja sõltuvus on sedavõrd kergem tekkima. Põhjus on ka nikotiini mõju NAc piirkonnale, milles tõuseb ekstratsellulaarse serotoniini tase, mis annab positiivse tagasiside ja heaolutunde (Yuan jt., 2015). Tulenevalt aju arengust on nikotiini mõjud noorukitele ja täiskasvanutele väga erinevad: võrreldes efektidega täiskasvanutele on noorukid tundlikumad nikotiini positiivsetele mõjudele, võõrutusnähud on kergemad, mõju liigutuskirusele parendav, ka kõrgemad nikotiini kogused on paremini talutavad; samas nooruki nikotiini tarvitamine suurendab soovi tarvitada teisi psühhostimulante nagu kokaiin ja amfetamiini ning alkoholi – sellist efekti täiskasvanute puhul ei täheldata (Yuan jt., 2015).

1.5 Suitsetamisest loobumise ravi

Suitsetamisest loobumiseks on kättesaadavad erinevate ravimvormidena nikotiini sisaldavad preparaadid. Eestis on müügiloaga ravimpreparaate saadaval suuõõnespreina (1 mg/1 pihustus), ravimnärimiskummina (2 või 4 mg/närimiskumm), transdermaalse plaastrina (7/14/24 mg/24h või 10/15/25 mg/16h) ja pressitud losengina (1,1/4 mg/loseng) (Ravimiamet, Ravimiregister, 2018). USA Toidu- ja Ravimiamet (US Food And Drug Administration, FDA) on lisaks nikotiini asendusravile heakskiitnud ka antidepressandina kasutatava bupropiooni sisaldavad preparaadid nikotiinsõltuvuse raviks. Bupropioon on katehholamiinide (noradrenaliini ja dopamiini) neuronaalse tagasihaarde selektiivne inhibiitor, ei pärsi monoamiinoksüdaase (Ravimiamet, Ravimiregister, 2018). Eestis on bupropioon (Elontril)

ravimi müügiloaga, näidustatud depressiooni raviks, kuid nikotiinisõltuvuse raviks ei ole ette nähtud (Ravimiamet, Ravimiregister, 2018).

Suitsetamisest loobumiseks näidustatud varenikliin loodi just eesmärgipäraselt, tegu on nAChRs osalise agonistiga (*partial agonist*, seostudes retseptoriga avaldab endogeensele ligandile sarnast toimet, kuid mitte maksimaalset toimet) (Tuesta jt, 2011). Varenikliin (Champix) omab Eestis ravimi müügiluba (Ravimiamet, Ravimiregister, 2018). Kliinilised uuringud on näidanud, et 12 nädalat kestnud 2 mg/päevas varenikliini ravi saanud katsealustest olid 13...24 nädala pikkusel ravijärgsel perioodil 20,8% võrra rohkemad jätkuvalt suitsetamisest loobunud (Champix 70,6% vs platseebo 49,8%) (Euroopa Meditsiini Agentuur, 2018). Kuid pikemaajalisel, 13...52 nädalat peale ravi varenikliiniga püsis suitsetamisest loobumine 44% ravi saanud katsealustel, ja platseebo grupis olnud katsealustest 37,1% suutsid säilitada nikotiini mittetarvitamist, erinevus kahe uuringugrupi vahel 6,9% (Euroopa Meditsiini Agentuur, 2018). Ravimitootja poolt tehtud uuringud on näidanud, et varenikliin seondub nikotiini atsetüülkoliiniliste retseptoritega $\alpha 4\beta 2$. Varenikliin stimuleerib nikotiinist vähemal määral retseptorite vahendatud aktiivsust; nikotiin ja varenikliin konkureerivad samale retseptorile seondumisele, millele varenikliin on afiinsem ja seeläbi takistab nikotiini aktiveerimast dopamiini süsteemi ja seega ei kaasne patsiendil nikotiini kasutamisega seotud naudingutunnet (Euroopa Meditsiini Agentuur, 2018).

Potsensiaalse ravimina võib välja tuua tsütisiini. Tegu on taimse alkaloidiga ja nikotiini osalise agonistiga, mis seondub nAChRs $\alpha 4\beta 2$ retseptorile ja mida kasutatakse osades Ida- ja Kesk-Euroopa riikides suitsetamisest loobumist kergedava ravimina (Zatonski jt., 2006, Ziedonis jt., 2017). Teiste seas kasutatakse ka mekamülamiini, mis on algselt hüpertensiooni ravimina turule tulnud. See blokeerib nAChRs $\alpha 3\beta 4$ ajus ja seetõttu on hakatud hiljem kasutama kui nikotiinisõltuvust leevendava ravimina, kuid ravimil pole paljudes riikides müügiluba (Lippiello, 2008, Ziedonis jt., 2017). Suitsetamisest loobumise uued ravimikandidaadid on eelkõige juba turul olevad ravimid, mille kohta farmaatsiafirmad teevad lisa kliinilisi ravimiuuringuid mõjust suitsetamisest loobumise edukusele.

Lisaks farmakoteraapiale on soovitatav kasutada nikotiini asendus ravi ja psühhoteraapiat koos, mis võiksid anda parema efekti nikotiini sõltuvusest vabanemiseks. Hetkel ei ole siiski head ühest müügiloaga ravimit, mis sobiks kõigile patsientidele ja oleks efektiivne ka pikaajaliselt. Sõltuvuse kujunemisel ja tugevusel, ja ka osade ravimpreparaatide efektiivsusel, on geneetiline taust, mistõttu on vaja personaalmeditsiinilist lähenemist uute ravimite

loomiseks ja ravi edukuse parandamiseks. USA kliiniliste uuringute andmebaasi andmetel 2018 aasta seisuga käimas 399 kliinilist uuringut, mis on seotud nikotiinisõltuvusega; enim uuringuid on bupropiooni ja varenikliini kohta sõltuvuse raviks, kuid uuritakse järjepidevalt ka sõltuvuse kujunemise mehhanisme ja organismis toimuvaid muutusi seoses nikotiini manustamisega. Mitmed uuringud kasutavad ka psühhotroopseid aineid nikotiini sõltuvuse raviks, sh ka hetkel käiv Johns Hopkinsi Ülikooli poolt sponsoreeritav suitsetamisest loobumise piloot ravimiuuring. Antud uuringu käigus manustatakse uuringualustele hallutsinogeenset psilotsübiini kõrges doosis (30 mg/70 kg kehakaalu kohta) ja lisaks osalevad uuritavad kognitiivses käitumisteraapias (U.S. National Library of Medicine, 2018). Uuringu eeldatav lõpp on detsember 2021. aastal.

Uuringud uute ravimite leidmiseks grupiti on: tritsüklilised antidepressandid, anksiolüütikumid, selektiivsed serotoniini tagasihaarde inhibiitorid, monoamiinoküdaaside inhibiitorid, nAChRs antagonistid, selektiivsed kannabinoid 1 retseptor antagonistid, dopamiini agonistid, noradrenaliini tagasihaarde inhibiitorid, ja nikotiini vastased vaktsiinid. Kõikide nende ravimrühmade seas olevad kandidaadid osalevad 1-4 faasi kliinilistes uuringutes.

1.6 Sõltuvuste senituvastatud geneetiline taust

Kaksikutel läbiviidavatest uuringutest on selgitatud, et nikotiinsõltuvuse, sh loobumisvõime ja päevas suitsetatud sigarettide hulk, puhul on oluline roll hinnanguliselt 50% geneetikal ja ülejäänut mõjutab keskkond (Lessov-Schlaggar jt., 2008). Sõltuvuste puhul on kõige tõenäolisemalt tegu polügeense haigusega ja nikotiinsõltuvuse puhul on tõenäoliselt tegu mitme erineva fenotüübiga, millel on erinev geneetiline taust (Benowitz, 2009). Siiani on uuritud hulgaliselt ühe nukleotiidseid polümorfisme (*single nucleotide polymorphisms*, SNP), mida seostatakse tubaka kasutamisega. Sobivaks näiteks *CHRNA5-A3-B4* geeniklastriis paiknevad SNPid, ehk tegu on nAChRs retseptorite geneetilise varieeruvusega, mistõttu on muuhulgas mõjutatud nikotiini seondumisvõime retseptorile (Weiss jt., 2008).

MAOA promootor piirkonnas on senituvastatult kaks VNTR-i (*variable number tandem repeats*) paiknemist, uVNTR (*upstream variable number tandem repeats*), ja sellest 500 bp ülevoolu (*upstream*) suunas paikneb d- ehk distaalne VNTR (dVNTR) (Manca jt., 2018). Mõlemi VNTR-i puhul on näidatud mõju *MAOA* geeni ekspressioonile, kuid teema vajab jätkuvalt põhjalikku uurimist (Manca jt., 2018).

2 EKSPERIMENTAALOSA

2.1 TÖÖ EESMÄRK

Magistritöö eksperimentaالosa eesmärgiks on:

1. selgitada monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seost nikotiinisõltuvuse tugevust mõjutavate tegurite vahel
2. selgitada monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seost nikotiinisõltuvusest vabanemise edukuse vahel
3. selgitada monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seost suitsetamise alustamise vanusega

2.2 MATERJALID JA METOODIKA

Käesoleva uurimustöö alguseks on uVNTR määramise PCR metoodika väljatöötamine vastavalt labori tingimustele ja katse nõudmistele. Valimi loomine, DNA eraldamine ja küsitluste läbiviimine ning kodeerimine olid osad suuremast projektist ja teostatud enne antud töö alustamist.

2.2.1 Valimi kirjeldus

Käesolev magistritöö on alguse saanud projekti "Eesti ja Vietnami koostöö meditsiiniteaduste valdkonnas" raames. Projektile on luba Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetika Komiteelt (luba nr 242/T-4), Da Nang University of Medical Technology and Pharmacy ja Hue University of Medicine and Pharmacy poolt heaks kiidetud projektide kasutatavad protokollid ja nõusolekuvormid.

Uuringusse kaasati 2015. aastal Kesk-Vietnami Na Dang ja Hue piirkondadest pärit mehi. Projekti eesmärgiks oli koguda 2000 isiku andmed ja DNA proovid. Uuring keskendus meestele, sest Vietnamiis on kultuurilistel põhjustel nais-suitsetajaid minimaalselt, suitsetavatesse naistesse suhtutakse ühiskondlikult halvaks panuga. Meeste seas on suitsetamine ühiskondlikult soositud ja omab pigem positiivset kui negatiivset kuvandit. Lisaks sellele *MAOA* polümorfismide määramise seisukohalt oli oluline just meestest koosnev valim, sest *MAOA* geen paikneb X-kromosoomil, mis tähendab, et meestel esineb homosügootne alleelivariant, naistel võib esineda heterosügootsus ja selle korral ei ole võimalik hinnata polümorfismi otsest mõju, vaid hindama peaks vastavate alleelide esinemise koosmõju nikotiinisõltuvuse teguritele.

Koguti täisealiste Vietnami meeste (n=1938) süljeproovid, millest eraldati DNA. Uuringus osalejad allkirjastasid nõusolekuvormi ja täitsid küsimustiku (Lisa 1) suitsetamiskäitumise kohta. Proovidest määrati monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismid ja valimist eemaldati DNAd, millel ei suudetud *MAOA*-uVNTR adekvaatselt määrata. Põhjuste seas võib nimetada eelkõige analüüsitulemustes esinenud heterosügootsust, mis viitas proovi saastumisele. Teiste põhjuste seas oli näiteks DNA hulga vähesus või PCR-i inhibiitorite esinemine proovis. Tulemusena moodustus 1722 mehe andmetest koosnev lõppvalim. Lõppvalimi moodustasid suitsetavad mehed (n=1355), kellest praegusi suitsetajaid oli 1153 ja endiseid suitsetajaid 202, ja mitte-suitsetajatest koosnev kontrollgrupp (n=367).

2.2.2 DNA eraldamine

Katsealuselt võetud süljeproovist eraldati Saliva DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Canada) abil genoomne DNA. DNA hulk kvantifitseeriti, kasutades NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetrit. Saadud DNA-d säilitati Eppendorfi katsutites, vastavalt markeeritud osalejale määratud koodiga, Tartu Ülikooli Bio- ja siirdemeditiini Instituudi Patofüsioloogia osakonnas, -80 °C juures.

2.2.3 Uuringus osalejate sõltuvuskäitumise taustinfo

Kõik uuringus osalejad täitsid küsimustiku (Lisa 1). Saadud andmed kodeeriti ja andmestik loodi kasutades veebi-põhist andmebaasi RedCap (*Research Electronic Data CAPture*) tarkvara. Osalejatel määrati küsimuste 10-15 (Lisa 1) põhjal nikotiini sõltuvuse tugevus kasutades Fagerströmi nikotiini sõltuvushinnangu skaalat (*Fagerström Test for Nicotine Dependence*, FTND). Sõltuvuse skaala on nullist kümneni, mille puhul 10 on maksimaalne füüsilise sõltuvuse tugevus.

2.2.4 uVNTR määramise PCR metoodika

Uuringuks vajalikud DNA-d eemaldati -80 °C sügavkülmast, sulatades vastavalt vajadusele, kuid säilitades +4 °C juures kasutusajaks. Kasutamisejärgselt toimus reagentide ja DNA sügavkülmutamine vastavates tingimustes.

Uuritavate MAOA-uVNTR polümorfismide määramiseks kasutati PCR (*Polymerase Chain Reaction*) metoodikat.

Praimerid (Tabel 2) lahjendati lõpp-kontsentratsioonini 10 pmol/μl, kasutades dietüülpürokarbonaadiga (*diethylpyrocarbonate*, DEPC)-töödeldud vett (Invitrogen, USA).

Tabel 2. Töös kasutatud DNA praimerid (Sabol jt., 1998)

	Praimer
Forward	5'-GAACGGACGCTCCATTCGGA-3'
Reverse	5'-ACAGCCTGACCGTGGAGAAG-3'

Kasutusel oli 5x HOT FIREPOL GC Master Mix (Solis BioDyne, Eesti), koostises DNA polümeraas, GC puhver, 7,5 mM MgCl₂, dNTP-d, veise seerumist eraldatud albumiin (*bovine serum albumin*, BSA). Juurde lisati MgCl₂ ja dimetüül sulfoksiidi (*dimethyl sulfoxide*, DMSO). Kogu PCR segu koostis esitatud (Tabel 3), antud kogused ühe analüüsitava kohta.

Tabel 3. PCR segu koostis

Komponent	Kogus	Lõpp kontsentratsioon
5x HOT FIREPOL GC Master Mix	3,0 µl	1x
25 mM MgCl ₂	0,3 µl	2 mM
Forward praimer	0,5 µl	0,25 µM
Reverse praimer	0,5 µl	0,25 µM
100% DMSO	1,5 µl	10%
gDNA	1,0 µl	Varieeruv
H ₂ O	8,2 µl	
Kokku	15,0 µl	

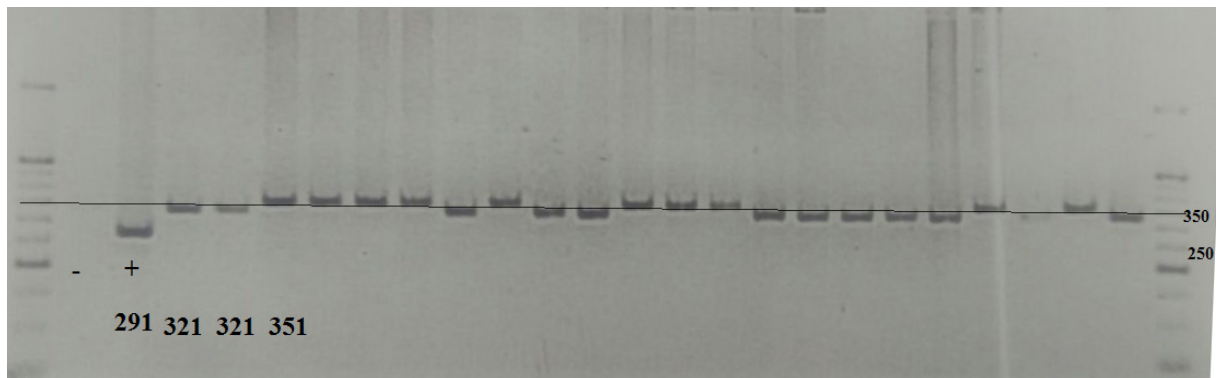
PCR viidi läbi Veriti 96 well Thermal Cycler masinal (Applied Biosystems, USA). PCR sooritamiseks vajalikud tingimused on toodud välja Tabelis 4, lähtuti Sabol jt. (1998) tööühma protokollist ja PCR lahuste tootja (Solis BioDyne) poolsetest juhistest.

Tabel 4. PCR tingimused

Etapp	Temperatuur (°C)	Kestvus	Tsükleid
Algne aktivatsioon	95	12´	1
Denaturatsioon	95	20´´	35
Praimerite seondumine	61	20´´	
Elongatsioon	72	30´´	
Lõplik elongatsioon	72	5´	1
Säilitus	4		1

Saadud tulemused interpreteeriti geel-elektroforeesil, mis viidi läbi elektroforeesiaparaadiga Bio-Rad Sub-Cell Model 192, kasutades 3% agaros-geeli (BioTop, Austria), millele lisati etiidiumbromiidi. PCR produktide suuruse hindamisel kasutati DNA markerina Generuler 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA). Visualiseerimiseks kasutati UV valgust (Syngene, UK). Tulemused pildistati (Syngene, UK), ja analüüsiti.

PCR produktide visualiseerimise ja pildistamise järgselt toimus tulemuste analüüs. DNA suurusmarkerist lähtuvalt hinnati produktide suurus (Joonis 3), positiivse kontrollina kasutati 291 bp suurust (2-kordusega alleel) produkti. Kõige sagedasemini esines 321 bp (3-kordusega alleel) ja 351 bp (4-kordusega alleel) suurust (Joonis 3). 5-kordusega alleel on 381 bp suurune.



Joonis 3. Geel-elektroforeesi interpretatsioon (+/- positiivne ja negatiivne kontroll).

2.2.5 Statistiline analüüs

Statistiline andmeanalüüs viidi läbi, kasutades vabavara „R” (versioon 3.4.4) (<http://www.r-project.org>) keskkonda, mille abil viidi läbi ANOVA ja TukeyHSD ning hii-ruut testid. Statistiliselt oluliseks tulemuseks loeti $p \leq 0,05$.

2.3 UURINGU PIIRANGUD

Käesoleva uuringu valim on vaid meestest, seega hinnatakse vaid homosügootset efekti haigusele ja seega ei ole teada heterosügootse variandi mõju. Samuti kuulusid valimisse vaid ühe riigi elanikud, kuigi erinevatest piirkondadest, on teatav uuringus osalejate heterogeensus mõjuteguriks, mistõttu ei pruugi uuringu tulemused olla rakendatavad kogu populatsioonile. Seoses kindla riigi elanike seas läbiviidud uuringus on oluline mõjutegur kultuurilisel ja sotsioökonomilisel eripäral, kuna nikotiinisõltuvus kui haigus on mõjutatud hinnanguliselt 50% ulatuses keskkonna poolt, Vietnami meeste seas on suitsetamine sotsiaalselt soositud, seega on suitsetajate osakaal populatsioonis kõrge ja nikotiinisõltuvus võib olla tugevam. Suitsetamiskäitumise kohta täitsid uuritavad küsimustiku iseseisvalt, mistõttu on ankeedi täitmisel andmed mõjutatud vastajate aususest, küsimuste mõistmisest ja uuritava mäletamisest suitsetamise alustamise vanuse kohta.

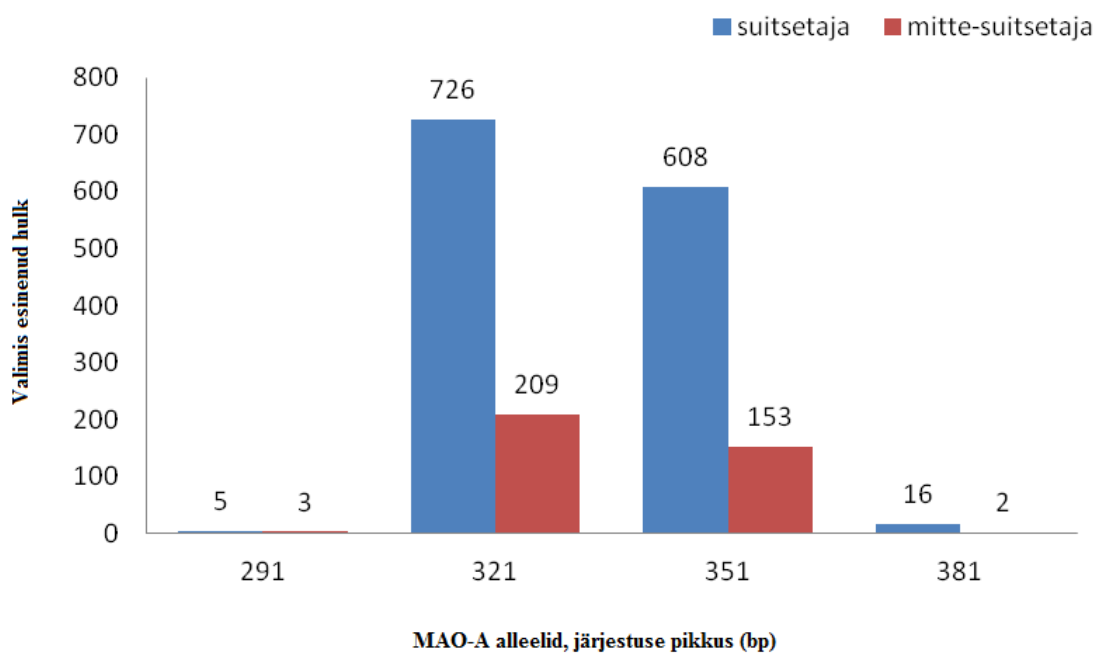
Uuringus määrati ja hinnati vaid ühe markeri seotust haigusega; ei hinnatud senituvastatud mõjutegurite koostoimed, kuigi haigus on polügeenne. Antud uuring on osaline suuremast uuringust, kus määratakse lisaks potentsiaalseid nikotiini-sõltuvust mõjutavaid markereid näiteks 5-HTTLPR (*seotonin-transporter-linked polymorphic region*) ja dVNTR polümorfisme ja hilisemal andmeanalüüsil on võimalik hinnata koosmõjusid, millesse kaasatakse ka antud uurimustöö tulemused.

2.4 TULEMUSED

2.4.1 Valimi ülevaatlilikud karakteristikud

Käesolevas uurimustöös määrati uuringus osalevate isikutelt saadud rakkudest eraldatud DNA põhjal *MAOA-uVNTR* polümorfismid, kasutades PCR meetodikat. Saadud DNA lõigud geel-elektroforeesiti ja seejärel pildistati ning analüüsiti tulemused. Saadud tulemuste ja katsealuste poolt täidetud küsimustike põhjal viidi läbi statistiline analüüs. Kogu valim moodustus 1722 mehe andmetest, kellest suitsetajaid oli 1355 (79%), sh praegusi suitsetajaid 1153 ja endiseid suitsetajaid 202, ja kontrollgrupi moodustavaid mitte-suitsetajaid mehi 367 (21%).

Määratud uVNTR polümorfismidest esines nelja alleeli: 291 bp ehk 2-alleel, 321 bp ehk 3-alleel, 351 bp ehk 4-alleel, 381 bp ehk 5-alleel (Joonis 4). Alleeli number määratud vastavalt 30 bp suuruse kordusjärjestuse korduste arvus järgi.



Joonis 4. Polümorfismide esinemine valimis suitsetamis-staatuse alusel

Enamlevinumad alleelid nii suitsetajate kui mitte-suitsetajate gruppides olid 3- ja 4-kordsete kordusjärjestustega (vastavalt 321 bp ja 351 bp pikkused järjestused) (Joonis 4). Suitsetajate grupis esines 291 bp pikkusega (2-kordusega) alleeli viiel uuritaval, samas mitte-suitsetajate seas kolmel; tegu kõige vähem esinenud variandiga. Suitsetajate grupis esines 321 bp pikkusega (3-kordusega) alleeli 726 uuritaval ja mitte-suitsetajate seas 209 korral; tegu kõige

sagedamini esinenud variandiga. 351 bp pikkusega (4-kordusega) aleeli esines 608 suitsetajate grupi uuritavatest ja 153 mitte-suitsetavatest uuritavatest. 5-kordusega alleel ehk 381 bp pikkusega järjestust esines suitsetajate rühmas 16 inimesel, mitte-suitsetajatest vaid kahel. Hinnati ankeedist saadud vastuse ja määratud *MAOA* alleelide esinemissageduse vahelisi seoseid hii-ruut testiga (Tabel 5). Statistiliselt oluliseks hinnati $p < 0,05$.

Tabel 5. Ülevaade faktorite ja *MAOA* alleelide seostest

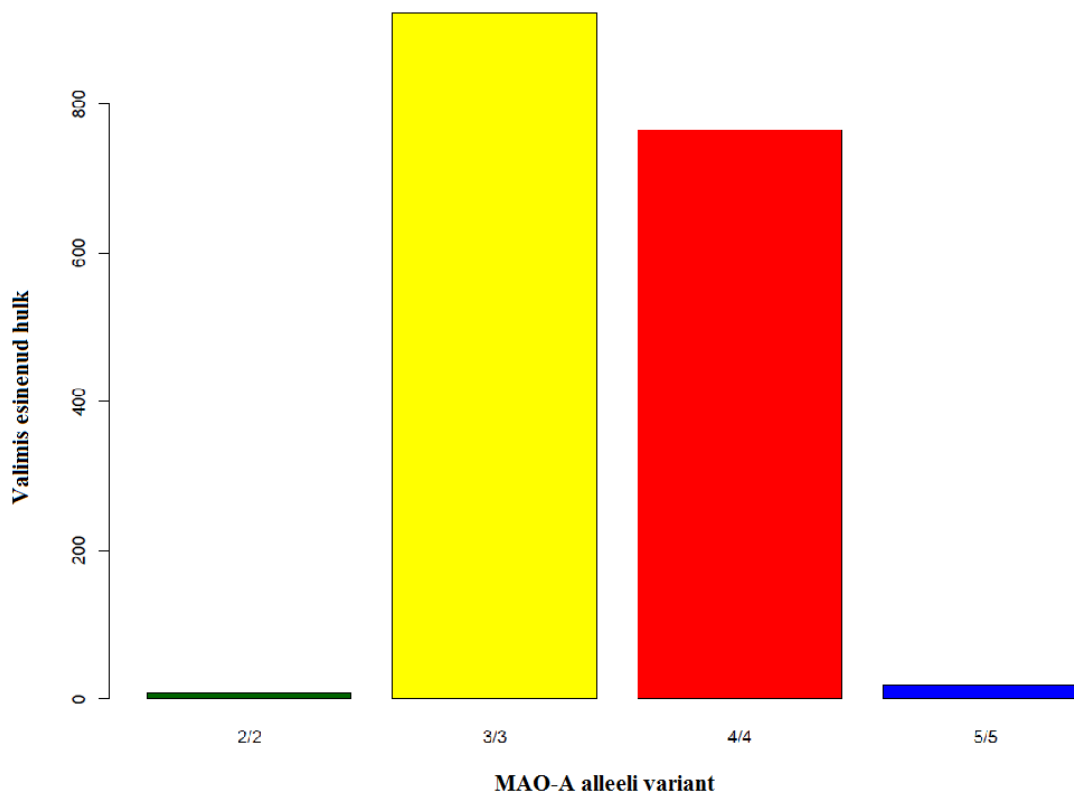
Faktor	Seos <i>MAOA</i> alleelidega, p-väärtus
Suitsetamise alustamise vanus	0,5812
Suitsetamise põhjus	0,5369
Peale ärkamist suitsetamise aeg	0,7952
Suitsetamisest hoidumine tubakakeeluga kohtades	0,2963
Millisest tubakavormist ei tahaks loobuda	0,4967
Suitsetatud sigarettide hulk päevas	0,3419
Suitsetamise sagedus hommikul suurem	0,3286
Kas suitsetad ka haigena päev otsa voodis olles	0,03357*
Suitsetamisest loobumise üritamine	0,1893
Suitsetamisest loobumise põhjus	0,6699
Suitsetamisest loobumise järel uuesti alustamine	0,5246
Suitsetamise uuesti alustamise põhjus	0,9051
FTND skoor	0,8198

* - p-väärtus statistiliselt oluline ($p < 0,05$.)

Oluliseimaks osutus seos *MAOA* alleelide ja haigena suitsetamise vahel ($p = 0,03357$) (Tabel 5).

2.4.2 Haigena suitsetamise seos *MAOA* alleelidega

Assotsiatsiooni analüüsil võrreldi ankeedi küsimuse „Kas suitsetad ka haigena päev otsa voodis olles” tulemusi. Andmetöötlustest selgines *MAOA* alleelide 3 ja 4 esinemine ($p=0,005746$) (Joonis 5).



Joonis 5. *MAOA* alleelide esinemine suitsetajatel, haiguse korral

2.4.3 *MAOA* polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusest vabanemisele

Sõltuvusest vabanemiseks on esmalt vaja patsiendipoolset tahet seda teha. Uuringus osalejate seast 38,6% ei ole kunagi proovinud suitsetamisest loobuda ja ei oma tahet seda teha. Samas 39% vastanutest on proovinud seda teha ühe korra, kuid õnnestub esimesel korral see vaid 25%.

Eeldus, et *MAOA* aktiivsus võiks mõjutada suitsetamisest loobumise tahet, põhineb monoamiinoksüdaaside toime lokaliseerimisel ajus - eessagaras ja *nucleus accumbens* (NAc) piirkondades. Eessagara puhul funktsiooniks muuhulgas tahte ja otsustusvõime omamine; NAc mõjutab mõnu, rahulolu jm., läbi serotoniini ja dopamiini, mida just MAO-A katalüüsib. Statistilisest analüüsist selgub, et monoamiinoksüdaas-A kõrgem aktiivsus (alleelid 4 ja 5, vastavalt 351 bp ja 381 bp) vähendab uuritavatel soovi suitsetamisest loobuda ($p=0,04905$).

2.4.4 MAOA polümorfismide mõju suitsetamise alustamise vanusele

Eessagara arengust lähtuvalt uuriti ka MAO-A mõju suitsetamise alustamise vanusele. Esmalt jaotati uuritavad kolme vanusegruppi: 1) suitsetamise algus enne 18.ndat (k.a) eluaastat 2) suitsetamise algus vahemikus 19 – 30. eluaastat k.a; 3) suitsetamise algus alates vanusest 31. aastat ja edasi. Hinnati MAO-A aktiivsuse rolli suitsetamise alustamise eale, kus 291/321 bp = madal aktiivsus ja 351/381 bp = kõrge aktiivsus.. Analüüsist selgus, et madalam MAO-A aktiivsus viitab suitsetamise varasemale alustamisele ($p=0,0345$).

Jagades uuringugrupp kaheks, lähtuvalt eessagara arengu küpsuse saavutamise east, 25 eluaastat, esimene grupp suitsetamise alustamise vanus kuni 25 a, ja teine grupp 26 ja vanemad. Selle puhul madalama MAO-A aktiivsuse ja nooremas vanusegrupis suitsetamise alustamise sagedasema esinemise vaheline seos tugevam ($p = 0,02355$).

2.5 ARUTELU

Nikotiini sõltuvust võib käsitleda kui kroonilist haigust. Paljud sõltuvuse käes kannatavad inimesed sageli proovivad küll suitsetamisest loobuda, kuid alustavad peagi taas suitsetamisega. Peamised põhjused taas-alustamiseks on võõrutusnähtude esinemine või stressi olukordades tuntav vajadus saada nikotiinist leevendust. Tegu on meditsiinilise probleemiga eelkõige seetõttu, et nikotiini manustatakse peamiselt tubaka suitsetamisega. Tubakasuitsu inhaleerimisel satub inimese kopsu kantserogeenseid ja kopsukudet ärritavaid ühendeid, mistõttu on tegu peamise kopsuvähi riskiteguriga. Kopsuvähk on ennetatav haigus, kuna haigusrisiki mõjutatavad nii suitsetamise kestus aastates, kui ka päevas suitsetatud sigarettide hulk. Sõltuvuse kujunemisel ja hiljem loobumise tahtel ning selle edukusel mängivad rolli nii keskkondlikud mõjutegurid, kui ka geneetiline taust. Ennetustöö raames saab mõjutada just keskkondlike tegureid, kuid nikotiinsõltuvuse kujunemise geneetiline eelsoodumus ja molekulaarse mudeli mõistmine on olulised haiguse ravis. Vajadus luua paremaid lahendusi sõltuvuse raviks ja suitsetamisest loobumise toetamiseks on suur.

Senini on laialdasemalt kasutusel nikotiini asendusteraapia, mis võimaldab suitsetamise kui nikotiini manustamisviisi välja vahetada. Probleem aga seisneb selliste ravimvormide kulukuses, mis ei pruugi sobida kõikidele suitsetajatele. Teiseks, tegu pole sõltuvuse raviga ja ei elimineeri põhjust, milleks sageli on psühholoogiline põhjus, miks inimene vajab nikotiini manustamist ja sellest loobumisel võib peagi saabuda tagasilangus ehk alustatakse uuesti suitsetamist. Efektiivsema ravi jaoks oleks vaja rakendada multiteraapiat ehk lisaks nikotiini asendus ravile e NRT-le (*nicotine replacement therapy*) ka psühhoteraapiat ja farmakoteraapiat. Kui NRT puhul on turul erinevaid ravimvorme, mille seast valida, ja psühhoteraapia puhul on võimalik kasutada kognitiiv-käitumisteraapia meetodeid, psühhodünaamilise psühhoteraapia meetodeid, aga samas ka pereteraapiat, siis farmakoteraapilisi ravimvorme on kättesaadaval vähe (Maar, 2015).

Farmakoloogiliste preparaatide vähesus on tingitud ravimiarenduse pikaldasest protsessist, aga ka sellest, et täpselt pole veel selge, mis peaks olema organismis sihtmärk. Teada on, et geneetika mõjutab inimeste haavatavust sõltuvuse kujunemisel, aga ka seda, kuidas ravimid inimesele mõjuvad. Nikotiinsõltuvuse puhul ei ole veel väga head ravimid, mis tuleks nikotiini sõltuvuse raviga efektiivselt toime. Küll on aga käimas hulgaliselt ravimuuringuid, leidmaks

paremaid lahendusi sõltuvusprobleemidele. Eelkõige kasutatakse juba turul olevaid ravimeid, katsetamaks nende efekti suitsetamisest loobumise edukusele.

Käesolevas uurimustöös vaadeldi monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismidest tingitud MAO-A aktiivsuse rolli nikotiini sõltuvuses. Kuna tegu on ühe osana suuremamahulisemast projektist, mille puhul laboratoorselt määratud faktoreid hetkel rohkem ei ole, ei olnud ka hetkel võimalik uurida koosmõjusid koos teiste projekti kandidaatgeenidega. Polügeenseid haiguseid, mida on ka nikotiinisõltuvus, uurides võib olla kohati üpriski keeruline hinnata vaid ühe haiguses rolli mängiva faktori tegelikku osakaalu.

Uuringu raames analüüsitud faktoritest oli statistiliselt oluline seos *MAOA* alleelide ja haigena suitsetamise vahel ($p=0,03357$). Faktor näitab sõltuvuse tugevust läbi selle, et voodis haigena olek on keha tsütohormonaalset regulatsiooni muutev, nii et organismil poleks vajadust nikotiini järele. On näidatud, et viirushaiguse korral suitsetamine on kahjulikum ja viirust ägendav, seega mitte tahtmine suitsetada võiks olla keha kaitsemehhanism, kuid senini ei ole identifitseeritud põhjust ja mehhanisme, kuidas see organismis toimub (Kang jt., 2008). Uuringuga näitasime, et *MAOA* alleelid võiksid mõjutada sõltuvuse tugevust. Erinevus seisneb kolmanda ja neljanda alleeli sageduse muutuses seoses vajadusega haigena suitsetatada. Madalama aktiivsuse puhul on soov suitsetada ka haigena suurem. Faktor on üheks FTND skoori määravaks küsimuseks, seega leides positiivset seost võiks aidata paremini mõista sõltuvuse tugevust mõjutavate faktorite geneetilist tagapõhja.

Samas, FTND järgi määratletud nikotiini sõltuvuse tugevuses MAO-A-ga statistiliselt olulist seost välja ei tulnud. Üheks põhjuseks võiks lugeda FTND skaala piiratuse, nimelt ei hinnata suitsetamisest hoidumise raskust ja suitsetamisest loobumise mitte-edukaid katseid. Need küsimused olid antud küsimustikus eraldi ja statistilises analüüsis hinnati neid sammuti eraldi, ilma FTND skoorita. FTND skaala on siiski seniolevatest nikotiini sõltuvuse tugevust määratlevatest skaaladest kõige põhjalikum ja seega pole alternatiivse testi kasutamine olnud otstarbekas.

Nikotiini sõltuvuse ravimite kliiniliste uuringute jaoks on olnud äärmiselt oluline teada saada just need kehaomased molekulide, mille toime mõjutab suitetamis-käitumist aga samas, mida oleks võimalik farmakoloogiliste preparaatidega mõjutada. Üheks paljulubavaks ravimigrupiks, mida uuritakse, on monoamiinoksüdaaside inhibiitorid ehk MAOId. Seos antidepressantide kasutamisega on mitmetahuline, esmalt MAOide kasutamisega inhibeeritakse monoamiinoksüdaaside tööd, mille tagajärjel dopamiini ja serotoniini tase

tõuseb. Uuringus näidati statistilist seost MAO-A kõrge aktiivsuse alleelide ja suitsetamise varasema alustamise ea vahel ($p=0,0345$ ja $p = 0,02355$). Võib hüpoteisierida, et noorukid, kellel on kõrge aktiivsusega alleel, võivad omada madalamaid dopamiini ja serotoniin hulkasid või nende vabanemisel lühiajalisemat efekti. Noorukite esmasel suitsetamise katsetamisel võib heatunde efekti anda just suitsetamisega kaasnev monoamiinoksüdaaside inhibitsioon (tubakasuitsus sisalduva norharmaan ja harmaan tõttu), lisaks nikotiini meelepärasele mõjule (Herraiz ja Chaparro, 2005). Antud uuringus näidati, et MAO-A mõjutab suitsetamise alustamist nooremalt kui 25 eluaastat ($p = 0,02355$), mis tõenäoliselt tuleb aju eessagara mitteküpsusest kuni just nimelt enne 25. eluaastat, eesagara arengu jooksul paraneb inimestel käitumuslik kontroll ja oluliselt näha oma tegude tagajärgi, mis puudutab ka tõenäoliselt noorte alustavate suitsetajate võimetust näha oma tegevuse tõsiseid tagajärgi ja mõjusid organismile.

Teisalt analüüsides, on näidatud suitsetamise peaaegu kaks korda sagedasem esinemine psühhiaatriliste haigustega inimestel (22% suitsetajatest ilma psühhiaatrilise haiguseta, 34,8% on elu jooksul diagnoositud psühhiaatriline haigus, 41% viimase kuu aja jooksul on esinenud psühhiaatriline haigus) (Lasser jt., 2000). Psühhiaatriliste haiguste taga on sagedasti just ajukeemia häired, ja selliste probleemidega patsiendid saavad suitsetamisega kaasnevast monoamiinide aktiivsuse mõjutamisest kasu. MAOide näidustuseks on depressiooni ravi, mille puhul monoamiinoksüdaaside tase on liiga kõrge. Nikotiinisõltuvuse raviks samuti võiks kasutada MAOIsid, kui patsiendil esineb depressioonile omased jooni, ja seda kui primaarset haigust ravides võiks väheneda ka sekundaarse haiguse ehk nikotiini vajaduse leevenemine. Suitsetamisest loobumine peaks sel juhul siis olema ka eelkõige patsiendipoolse sooviga, sest loobumise puhul mängib rolli ka psühholoogilisest sõltuvusest vabanemine. Nikotiini sõltuvust tuleks kindlasti käsitleda kui haigust ja jätkata teadusliku tööga selle põhjuste ja toimemehhanismide selgitamiseks. Tuleviku suunaks võiks olla uurida haiguse fenotüübi, MAO geenide polümorfismide ja suitsetamise mõjude seost.

Efektiivse ravijuhise ja uute farmakoloogiliste preparaatide loomise aluseks olevaid teadussuundasid oleks rohkelt. Vajadus on leida teisi sõltuvust mõjutavaid faktoreid, nagu selle uurimustöö puhul oli näha, siis üks faktor mängib nikotiini sõltuvuses vaid minimaalset rolli. Haiguse puhul on tegu kindlasti polügeense ja eri faktorite additiivsete mõjudega seotud häirega. Kui see uurimus keskendus MAO-A efektile, siis uurimist väärt on ka MAO-B, sest ensüümidel on kattuvaid funktsioone ja nad on võimelised teineteise tööd osaliselt

kompenseerima. Senini on MAO-A olnud teaduslikult rohkemal määral huvipakkuv, seetõttu MAO-B rollist on vähem teada. Ka MAO-A puhul on rohkelt veel uurimist ja siin uuringus näitasime, et MAO-A roll on oluline ning edasised teadusuuringud sellel teemal on jätkuvalt vajalikud. Edaspidiselt tasuks uurida *MAOA* geeni promootorpiirkonna uVNTR polümorfismide poolt geneetiliselt determineeritud aktiivsuse vastavust veres määratava MAO-A kontsentratsiooniga, ja ka aju piirkondades avaldatava mõju erisust seoses nikotiini tarvitamisega. Samas uuritakse edasi ka *MAOA* geeni dVNTR polümorfisme, mis samuti mõjutavad ensüümi aktiivsust.

Nikotiinisõltuvuse uuringutes jätkatakse kindlasti ka nikotiini retseptorite polümorfismide uurimisega, *CHRNA* geenide erisused on kindlasti seotud nikotiini mõjudega erinevatel inimestel. Ülegenoomseid assotsiatsiooni uuringud (*genome-wide association studies*, GWAS) on siinkohal paljuski teadusuuringutele pakkunud uusi uurimissuundasid ja seoseid geeniklastrite vahel.

JÄRELDUSED

Lõputöö eesmärkidest tulenevad järeldused:

1. selgitati statistilise analüüsiga monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seos nikotiinisõltuvuse tugevust mõjutava teguri – haigena suitsetamise vajaduse – vahel positiivse seose olemasolu. Kõrgema aktiivsuse korral sõltuvus tugevam, $p=0,005746$.
2. selgitati monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seos ja selle mõju nikotiinisõltuvusest vabanemise tahtele. MAO-A kõrgem aktiivsus mõjutab suitsetamisest loobumise tahtmist vähendavalt, $p= 0,04905$.
3. selgitati seost monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide ja suitsetamise alustamise vanuse vahel. Madalam aktiivsus mõjutab nooremalt suitsetamise alustamise vanus, $p=0,0345$.

KOKKUVÕTE

Suitsetamine on riskitegur erinevate vähkide tekkimisel, samuti südame-ja veresoonkonna haiguste kujunemist soodustav. Suitsetamise põhjuseks on nikotiini sõltuvus. Täpselt ei ole veel teada nikotiini sõltuvuse kujunemise molekulaarseid mehhanisme. Suitsetamine on ülemaailmne probleem, seega on tegu vägagi aktuaalse temaatikaga, millega teadusvaldkonnad ka aktiivselt tegelevad.

Käesoleva magistritöö eesmärkideks oli selgitada monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide seost nikotiinisõltuvuse tugevust mõjutavate tegurite vahel, nikotiinisõltuvusest vabanemise edukuse vahel ja mõju suitsetamisega alustamise vanusele. Selle jaoks määrati uuringus osalejatel MAOA-uVNTR polümorfismid ja osalejate poolt vastatud küsimustike vahel viidi läbi statistiline analüüs. Tulemusi analüüsides leiti, et uVNTR polümorfismide alleelid avaldavad mõju nikotiini sõltuvuse tugevusele, läbi haigena suitsetamise vajaduse – madalama aktiivsusega alleelid (peamiselt 3-allel) suurendavad vajadust. Nikotiini sõltuvusest vabanemist uurides analüüsiti osalejate motivatsiooni ehk tahet suitsetamisest loobuda, monoamiinoksüdaas-A kõrgem aktiivsus (alleelid 4 ja 5) vähendab uuritavatel soovi suitsetamisest loobuda. Monoamiinoksüdaas-A aktiivsus mõjutab ka suitsemisega alustamise vanust, madalam MAO-A aktiivsus viitab suitsetamisega alustamisele noorukieas.

Selle magistritöö tulemused näitavad, et uVNTR polümorfismide poolt mõjutatav MAO-A aktiivsus omab rolli nikotiini sõltuvuse kujunemises ja selle tugevuses. Kinnitust leiab, et nikotiini sõltuvuse puhul on kindlasti tegu polügeense ja multifaktoriaalse haigusega, mis on mõjutatud nii keskkonnast kui ka geneetikast. Seetõttu vajab nikotiini sõltuvuse ravi mitmekülgsemat lähenemist, et suitsetamisest oleks võimalik loobuda enne kasvajate arengut. Ravi parendamiseks ja haiguse täpsemate mehhanismide mõistmiseks on kindlasti oluline jätkata sõltuvushäirete teadustöödega.

Monoamine oxidase A uVNTR polymorphism impact on nicotine addiction in Vietnamese males

Hannaliis Ansip

SUMMARY

Smoking is a risk factor for many cancers, diseases of the pulmonary system and cardiovascular problems. Discovering the molecular mechanisms of nicotine addiction is vital, for better understanding of the disease and for creating better pharmacological options for addiction management.

The aim of this thesis was to assess the effects of monoamine oxidase A gene promotor region (uVNTR) polymorphisms on nicotine addiction, the age of starting smoking, and effects on quitting smoking. Through PCR analysis of the DNAs collected from the participants and the data collected from the questionnaires, the statistical analysis was carried out. The following conclusions were made:

- uVNTR polymorphisms affect nicotine addiction strength through MAO-A activity changes. Lower activity (allele 3) of MAO-A affects nicotine addiction through a factor – smoking when ill in bed most of the day – which means higher addiction.
- uVNTR alleles 4 and 5 (higher activity) affect the will to quit smoking. Higher activity MAO-A causes the addicts to not want to quit, more than those with lower activity MAO-A allele.
- uVNTR polymorphisms affect the age of starting smoking. Lower activity (allele 3) seems to cause earlier starting of smoking.

Results of this Master's thesis show that uVNTR polymorphisms effect on MAO-A activity affects nicotine addiction development. It is concluded, that nicotine addiction is multifactorial disease and is affected by more than one gene. Both genetics and environment have a role in disease formation. Better treatment options are necessary for nicotine addiction. It is hoped that through scientific discoveries we gain better understanding of the disease and pharmacology industry will be helped in the discovery of better drugs to help eliminate addiction.

TÄNUAVALDUSED

Autor avaldab tänu juhendajatele Sulev Kõksile, MD, PhD, Tartu Ülikool, Bio-ja Siirdemeditisiini Instituut, Patofüsioloogia osakond; doktorant Ele Pransile, MSc, Tartu Ülikool, Bio-ja Siirdemeditisiini Instituut, Patofüsioloogia osakond; ja Olga Žilinale, PhD, Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia Instituut. Siirad tänusõnad Aivar Oravale, MSc, SA Tartu Ülikooli Kliinikum, ja doktorant Kārol Soidlale, MSc, SA Tartu Ülikooli Kliinikum, kelle tarkadele sõnadele toetudes jõudis lõputöö valmis.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of Nicotine: Addiction, Smoking-Induced Disease, and Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 57–71. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742>
- Brummett, B. H., Krystal, A. D., Siegler, I. C., Kuhn, C., Surwit, R. S., Züchner, S., Ashley-Koch, A., Barefoot, J. C., Williams, R. B. (2007). "Associations of a Regulatory Polymorphism of Monoamine Oxidase-A Gene Promoter (MAOA-uVNTR) With Symptoms of Depression and Sleep Quality." *Psychosomatic medicine* 69(5): 396-401. doi: 10.1097/PSY.0b013e31806d040b
- Domschke, K., Sheehan, K., Lowe, N. ... Hawi, Z. (2005). "Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: Preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children." *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 134B(1): 110-114. doi: 10.1002/ajmg.b.30158
- Gaweska, H., Fitzpatrick, F. P. (2011). Structures and mechanism of the monoamine oxidase family. *BioMolecular Concepts*. 2: 365.
- Goriounova, N. A., Mansvelder, H. D. (2012). Short- and Long-Term Consequences of Nicotine Exposure during Adolescence for Prefrontal Cortex Neuronal Network Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12), 10.1101/cshperspect.a012120 a012120. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012120>
- Guillem, K., Vouillac, C., Azar, M. R., Parsons, L. H., Koob, G. F., Cador, M., Stinus, L. (2005). Monoamine Oxidase Inhibition Dramatically Increases the Motivation to Self-Administer Nicotine in Rats. *Journal of Neuroscience* 21 September 2005, 25 (38) 8593-8600; doi:10.1523/JNEUROSCI.2139-05.2005'
- Ho, M. K., Tyndale, R. F. (2007). "Overview of the pharmacogenomics of cigarette smoking." *The Pharmacogenomics Journal* 7: 81.
- Hendrickson L., Guildford M., Tapper A. (2013). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Common Molecular Substrates of Nicotine and Alcohol Dependence. *Frontiers in Psychiatry* 4: 29. doi:10.3389/fpsy.2013.00029

- Herraiz, T., Chaparro, C. (2005). "Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: β -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 326, Issue 2, Pages 378-386.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.033>.
- Innos, K., Aareleid, T. (2016) Vähielulemuse suurenemine Eestis aastatel 2010–2014 jätkus. *Eesti Arst* 2016; 95(6):366–372.
- Jacob, C. M., Schmidt, M., Hohenberger, K., Gutknecht, L., Reif, A., Schmidtke, A., Mossner, R., Lesch, K. P. (2005). "Cluster B personality disorders are associated with allelic variation of monoamine oxidase A activity." *Neuropsychopharmacology* 2005 Sep; 30(9):1711-8.
- Kang, M-J., Lee, C. G., Lee, J-Y., Dela Cruz, C. S., Chen, Z. J., Enelow, R., Elias, J. A. (2008). Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice. *J Clin Invest*. 2008; 118(8):2771-2784. <https://doi.org/10.1172/JCI32709>.
- Kõks, G., Fischer, K., Kõks, S. (2017). Smoking-related general and cause-specific mortality in Estonia. *BMC Public Health*, 18, 34. <http://doi.org/10.1186/s12889-017-4590-3>
- Lasser K, Boyd JW, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormick D, Bor DH. (2000) Smoking and Mental Illness A Population-Based Prevalence Study. *Journal of American Medical Association*. 2000;284(20):2606–2610.
[doi:10.1001/jama.284.20.2606](https://doi.org/10.1001/jama.284.20.2606)
- Lessov-Schlaggar, C. N., Pergadia, M.L., Khroyan, T. V., Swan, G. E., (2008). Genetics of nicotine dependence and pharmacotherapy. *Biochem. Pharmacol.* 75:178-195.
- Lippiello, P. M., Beaver, J. S., Gatto, G. J., James, J. W., Jordan, K. G., Traina, V. M., Xie, J., Bencherif, M. (2008), TC-5214 (S-(+)-Mecamylamine): A Neuronal Nicotinic Receptor Modulator with Antidepressant Activity. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 14: 266-277. [doi:10.1111/j.1755-5949.2008.00054.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2008.00054.x)
- Manca, M., Pessoa, V., Lopez, A.I. et al. (2018) The Regulation of Monoamine Oxidase A Gene Expression by Distinct Variable Number Tandem Repeats. *J Mol Neurosci* 64: 459. <https://doi.org/10.1007/s12031-018-1044-z>

- McAllister, T. W. (2015). Chapter 45 - Genetic factors in traumatic brain injury. *Handbook of Clinical Neurology*. J. Grafman and A. M. Salazar, Elsevier. 128: 723-739.
- Meyer, J. H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., Young, T., Praschak-Rieder, N., Wilson, A.A., Houle, S. (2006). "Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: An explanation for the monoamine imbalance of major depression." *Archives of General Psychiatry* 63(11): 1209-1216.
- Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S., Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21: 7435–7451. doi:10.1038/sj.onc.1205803
- Picciotto, M. R., Kenny, P. J. (2013). Molecular mechanisms underlying behaviors related to nicotine addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1), a012112. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012112>
- Sabol, S., Hu, S., Hamer, D. (1998). A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* 103: 273. <https://doi.org/10.1007/s004390050816>
- Stahl, S. M., A. Felker (2008). "Monoamine oxidase inhibitors: a modern guide to an unrequited class of antidepressants." *CNS spectrums* 13(10): 855-871.
- Zatonski, W., Cedzynska, M., Tutka, P., West, R. (2006). An uncontrolled trial of cytisine (Tabex) for smoking cessation. *Tobacco Control*, 15(6), 481–484. <http://doi.org/10.1136/tc.2006.016097>
- Ziedonis, D., Das, S., Larkin, C. (2017). Tobacco use disorder and treatment: new challenges and opportunities. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(3), 271–280.
- Tuesta, L., Fowler, C. D., Kenny, P. J. (2011). Recent advances in understanding nicotinic receptor signaling mechanisms that regulate drug self-administration behavior. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 984–995. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.026>
- Van Minh, H., Giang, K.B., Ngoc, N.B. et al. (2017) *Int J Public Health* 62(Suppl 1): 121. <https://doi.org/10.1007/s00038-017-0955-8>
- Veideman, M., Tekkel, T. (2017). Eesti täiskasvanud rahvastiku tervisekäitumise uuring, 2016. Tervise Arengu Instituut.

- Voltas, N., Aparicio, E., Arijia V., Canals, J. (2015). "Association study of monoamine oxidase-A gene promoter polymorphism (MAOA-uVNTR) with self-reported anxiety and other psychopathological symptoms in a community sample of early adolescents." *Journal of Anxiety Disorders* 31: 65-72.
- Weiss, R. B., Baker T. B., Cannon, D. S., von Niederhausen, A., Dunn, D. M., et al. (2008). A Candidate Gene Approach Identifies the *CHRNA5-A3-B4* Region as a Risk Factor for Age-Dependent Nicotine Addiction. *PLOS Genetics* 4(7): e1000125. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000125>
- World Health Organization. (2017). WHO report on the global tobacco epidemic, 2017: Monitoring tobacco use and prevention policies.
- Yuan, M., Cross, S. J., Loughlin, S. E., Leslie, F. M. (2015). Nicotine and the adolescent brain. *The Journal of Physiology*, 593(Pt 16), 3397–3412.
<http://doi.org/10.1113/JP270492>
- Youdim, M. B., Edmondson D., Tipton K. F. (2006). "The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors." *Nature Reviews Neuroscience* 7(4): 295.

Kasutatud veebileheküljed:

Centers for Disease Control and Prevention (2017).

<https://www.cdc.gov/tobacco/campaign/tips/resources/data/cigarette-smoking-in-united-states.html> 12.04

https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm 13.04

Euroopa Meditsiini Agentuur (2018).

http://www.ema.europa.eu/docs/et_EE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000699/WC500025251.pdf 12.04.2018

Maar, A. (2015).

<https://www.regionaalhaigla.ee/et/kuidas-vabaneda-soltuvusest> 15.04

Ravimiamet, Ravimiregister (2018).

<http://ravimiregister.ravimiamet.ee/default.aspx?pv=HumRavimid.Otsing> 12.04.2018

http://ravimiregister.ravimiamet.ee/Data/SPC/SPC_1232693.pdf 12.04.2018

U.S. National Library of Medicine, (2018)

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01943994> 12.04.2018

<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=nicotine+addiction> 12.04.2018

WHO (2016)

http://gamapsserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Tobacco_use_2015.png 20.04

LISA 1. Osalejate ankeet

Ankeedi küsimused tõlgitud originaalkeelest inglise keelde küsitluse läbiviijate poolt, seejärel vabas vormis tõlge eesti keelde uurimustöö autori poolt. Küsimused 10-15 of Fagerströmi testi küsimused.

- 1) Sünniaasta/ Year of birth
- 2) Sugu/ Sex
- 3) Rahvus/ Ethnicity
- 4) “Kas sa oled suitsetanud vähemalt ühe aasta?”/ “Have you ever smoked at least one year?”
- 5) Kas sa oled praegune või endine suitsetaja?/ “Are you current or former smoker?”
- 6) Vanus suitsetamise alustamisel/ Age of starting smoking
- 7) Suitsetamisest loobumise vanus/ Age of stopping smoking
- 8) Kasutatavate tubakatoodete tüüp/ Types of tobacco products
- 9) Suitsetamise peamine põhjus/ The main cause of smoking
- 10) Kui kaua peale ärkamist läheb aega, enne esimest suitsetamist?/ “How soon after waking up do you smoke your first tobacco?”
- 11) Kas sul esineb raskusi suitsetamisest hoidumisega seda keelavas kohas?/ “Do you find it difficult to refrain from smoking in places where it is forbidden?”
- 12) Millisest tubakatootest loobumine oleks kõige ebameeldivam?/ “Which tobacco would you hate most to give up?”
- 13) Mitu sigaretti päevas sa suitsetad?/ “How many cigarettes per day do you smoke?”
- 14) Kas sa suitsetad hommikuti sagedamini?/ “Do you smoke more frequently in the morning?”
- 15) Kas sa suitsetad ka siis, kui sa oled enamuse päevast voodis haige?/ “Do you smoke even if you are sick in bed most of the day?”

- 16) Kas sa oled kunagi proovinud suitsetamisest loobuda?/ “Have you ever tried to quit smoking?”
- 17) Mis põhjustel oled sa proovinud suitsetamisest loobuda?/ “For what reasons have you tried to quit smoking?”
- 18) Kas sa oled loobumise järgselt uuesti suitsetama hakanud?/ “Have you re-started smoking again?”
- 19) Miks sa alustasid uuesti suitsetamist, peale loobumise üritamist?/ “Why did you re-start smoking again?”

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Hannaliis Ansip, (sünnikuupäev: 21.04.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose, **Monoamiinoksüdaas-A uVNTR polümorfismide mõju nikotiinisõltuvusele Vietnami meeste seas**, mille juhendaja on Sulev Kõks, MD, PhD, Ele Prans, MSc, Olga Olga Žhilina, PhD
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 25.05.2018